

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

JP1993285374A

1993-11-2

## Bibliographic Fields

## Document Identity

(19)【発行国】

日本国特許庁(JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報(A)

(11)【公開番号】

特開平5-285374

(43)【公開日】

平成5年(1993)11月2日

## Public Availability

(43)【公開日】

平成5年(1993)11月2日

## Technical

(54)【発明の名称】

再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセル  
及びその製造方法

(51)【国際特許分類第5版】

B01J 13/04

A61K 9/50 A 7329-4C

47/42 D 7433-4C

B01J 13/02

C08L 89/04 LSE 7415-4J

【FI】

B01J 13/02 A 8317-4G

L 8317-4G

【請求項の数】

8

【全頁数】

9

## Filing

【審査請求】

未請求

(21)【出願番号】

特願平4-116819

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application]

Japan Unexamined Patent Publication Hei 5 - 285374

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1993 (1993) November 2 days

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1993 (1993) November 2 days

(54) [Title of Invention]

MICROCAPSULE AND ITS MANUFACTURING  
METHOD WHICH DESIGNATE REGENERATION  
NATURAL KERATIN AS WALL MATERIAL

(51) [International Patent Classification, 5th Edition]

B01J 13/04

A61K 9/50 A 7329-4C

47/42 D 743 3- 4C

B01J 13/02

C08L 89/04 LSE 7415-4J

【FI】

B01J 13/02 A 8 31 7-4G

L 8 31 7-4G

【Number of Claims】

8

【Number of Pages in Document】

9

【Request for Examination】

Unrequested

(21) [Application Number]

Japan Patent Application Hei 4 - 116819

JP1993285374A

1993-11-2

(22)【出願日】

平成4年(1992)4月9日

(22) [Application Date]

1992 (1992) April 9 days

**Parties**

**Applicants**

(71)【出願人】

【識別番号】

592005788

【氏名又は名称】

山内 清

【住所又は居所】

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(71) [Applicant]

[Identification Number]

592005788

[Name]

YAMAUCHI IT IS CLEAR

[Address]

Osaka Prefecture Kawachinagano City north Aobadai 27 - 19

(71)【出願人】

【識別番号】

000000952

【氏名又は名称】

鐘紡株式会社

【住所又は居所】

東京都墨田区墨田五丁目17番4号

(71) [Applicant]

[Identification Number]

000000952

[Name]

KANEBO LTD. (DB 69-053-5489)

[Address]

Tokyo Prefecture Sumida-ku Sumida 5-17-4

**Inventors**

(72)【発明者】

【氏名】

山内 清

【住所又は居所】

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(72) [Inventor]

[Name]

Yamauchi it is clear

[Address]

Osaka Prefecture Kawachinagano City north Aobadai 27 - 19

**Agents**

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】

赤岡 逸夫

**Abstract**

(57)【要約】

【目的】

本発明は、ペプチド結合切断による短鎖化処理  
その他の非可逆的化学修飾を伴わないケラチ  
ンを壁材として含む、均一性、安定性及び生体  
適合性等に優れ且つ含包量が大い再生天然  
ケラチンを壁材とするマイクロカプセル及びその

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

[Name]

Akaoka Michio

(57) [Abstract]

[Objective]

this invention short chain conversion includes keratin which  
does not accompany treatment other irreversible chemical  
modification with peptide bond cutting as wall material offer  
of the microcapsule and its manufacturing method which  
designate regeneration natural keratin where being

製造方法の提供を目的とする。

#### 【構成】

ケラチン含有物質を液体媒体中にて還元剤により処理してケラチンを抽出し該抽出液より前記還元剤を除去することにより得られる水溶性ケラチンを壁材として不溶化してなるマイクロカプセル及び、前記水溶性ケラチンの水溶液を水に不溶性又は難溶性の有機溶媒と混合しこれを超音波処理及び/又は激しく攪拌することとを特徴とする、再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルの製造方法。

#### Claims

##### 【特許請求の範囲】

##### 【請求項 1】

再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセル。

##### 【請求項 2】

該再生天然ケラチンが、ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンを、マイクロカプセルの壁の形態に不溶化させてなるものである、請求項 1 に記載のマイクロカプセル。

##### 【請求項 3】

マイクロカプセルの壁材が、ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンと、メルカプト基若しくはジスルフィド結合を有するタンパク質若しくはポリペプチド及び/又はメルカプト基若しくはジスルフィド結合を担持したポリビニルアルコールとの混合物を、マイクロカプセルの壁の形態に不溶化させてなるものであることを特徴とするマイクロカプセル。

##### 【請求項 4】

ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンを、壁材原料として芯物質の周囲に被覆させて不溶化させることとよりなる、再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルの製造方法。

##### 【請求項 5】

superior and containing package quantity are large to uniformity, stability and the biocompatibility etc as wall material is designated as objective.

#### 【Constitution】

Treating with reductant, it extracts keratin and insolubilization doing the keratin containing substance in liquid medium with water solubility keratin which is acquired by removing the aforementioned reductant from said extracted liquid as wall material, aqueous solution of the microcapsule and aforementioned water solubility keratin which become it mixes with the organic solvent of insolubility or poorly soluble to water and this ultrasonic treatment and/or it agitates makes feature extremely, manufacturing method. of microcapsule which designates regeneration natural keratin as wall material

#### 【Claim(s)】

##### 【Claim 1】

microcapsule, which designates regeneration natural keratin as wall material

##### 【Claim 2】

said regeneration natural keratin, treating with reductant keratin containing substance in liquid medium, the insolubilization doing water solubility keratin which is acquired by extracting keratin, in morphological form of wall of microcapsule, it is something which becomes, the microcapsule, which is stated in Claim 1

##### 【Claim 3】

wall material of microcapsule, treating with reductant keratin containing substance in the liquid medium, mixture of water solubility keratin which is acquired by extracting the keratin and polyvinyl alcohol which bears protein or polypeptide and/or mercapto group or disulfide bond which possess mercapto group or disulfide bond, insolubilization doing in morphological form of wall of microcapsule, it is something which becomes and microcapsule, which is made feature

##### 【Claim 4】

Treating with reductant keratin containing substance in liquid medium, covering in the periphery of core substance with water solubility keratin which is acquired by extracting the keratin, as wall material starting material, manufacturing method. of microcapsule which consists of fact that insolubilization it does, designates regeneration natural keratin as wall material

##### 【Claim 5】

ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンと、メルカプト基若しくはジスルフィド結合を有するタンパク質若しくはポリペプチド及び/又はメルカプト基若しくはジスルフィド結合を担持したポリビニルアルコールとの混合物を、壁材原料として芯物質の周囲に被覆させこれを不溶化させることよりなるマイクロカプセルの製造方法。

#### 【請求項 6】

該壁材原料を含む水溶液を水に不溶性又は難溶性の液状物質である芯物質と混合し、これを超音波処理及び/又は激しく攪拌することを特徴とする、請求項 4 又は 5 に記載の製造方法。

#### 【請求項 7】

チオール基をジスルフィド結合に変換し得る酸化剤を前記超音波処理及び/又は激しい攪拌の前に添加し攪拌することを特徴とする、請求項 6 に記載の製造方法。

#### 【請求項 8】

該超音波処理及び/又は激しい攪拌を酸化能力を欠くガス雰囲気下にて行った後、チオール基をジスルフィド結合に変換し得る酸化剤を添加し攪拌することを特徴とする、請求項 6 に記載の製造方法。

#### Specification

##### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【産業上の利用分野】

本発明は、再生天然ケラチンを壁材として含有する、染料、香料、医薬品、農薬、酵素その他の薬剤の包含に又は酵素等の固定化に好適なマイクロカプセル及びその製造方法に関する。

本明細書において「再生天然ケラチン」とは、天然のケラチンに対して酵素等によるペプチド結合の加水分解処理を加えることなく、かつその他の非可逆的の化学処理をも加えることなく、ジスルフィド結合を還元してチオール基としてケラチンを一旦可溶化した後、再度チオール基同士をジスルフィド結合させることにより再度不溶化してなる、再生した高分子をいう。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

従来、医薬品等を含包させて安定性や放出特

manufacturing method. of microcapsule which consists of fact that treating with reductant keratin containing substance in in liquid medium, covering in periphery of the core substance with mixture of polyvinyl alcohol which bears protein or polypeptide and/or mercapto group or disulfide bond which possess water solubility keratin and mercapto group or disulfide bond which are acquired by extracting keratin, as wall material starting material, insolubilization it does this

#### 【Claim 6】

manufacturing method. where it mixes aqueous solution which includes said wall material starting material with the core substance which is a liquid substance of insolubility or poorly soluble in water, this ultrasonic treatment and/or it agitates makes feature extremely, states in the Claim 4 or 5

#### 【Claim 7】

manufacturing method. where it adds oxidant which can convert thiol group to the disulfide bond before aforementioned ultrasonic treatment and/or extreme churning and it agitates makes feature, states in Claim 6

#### 【Claim 8】

manufacturing method. where said ultrasonic treatment and/or extreme churning after doing under gas atmosphere which lacks oxidizing capability, it adds oxidant which can convert thiol group to disulfide bond and it agitates makes feature, states in the Claim 6

#### 【Description of the Invention】

##### 【0001】

##### 【Field of Industrial Application】

this invention contains regeneration natural keratin, as wall material dye, perfume, the drug, pesticide, enzyme other chemical it includes or it regards preferred microcapsule and its manufacturing method in enzyme or other fixation.

Reducing disulfide bond without, at same time adding also other irreversible chemical treatment without adding hydrolysis of peptide bond with such as enzyme in the this specification "regeneration natural keratin" with, vis-a-vis natural keratin, after solubilizing doing keratin once as thiol group, insolubilization doing for second time by disulfide bond doing thiol group for second time, it becomes, it is polymer which regeneration is done.

##### 【0002】

##### 【Prior Art】

Until recently, containing package doing drug, etc

性その他の種々の性質を改善する等の目的でマイクロカプセルが開発されている。

## 【0003】

マイクロカプセルの壁材として使用される材料物質には、簡単な装置と方法によりマイクロカプセルを製造できる等取扱が容易であることや、得られるマイクロカプセルがカプセル自体の量に対する薬剤等の包含量が大きいものであることが求められる。

更に医薬品や農薬等に使用するマイクロカプセルにおいては特に、生体適合性に優れること、取り分け毒性上問題となる架橋剤を使用せずに製造できるものであること、生分解性を有すること等の特徴が求められる。

このためには、医薬品等に使用し得るマイクロカプセルの壁材原料としては生体物質を天然の又はこれに極めて近い状態で用いることが好ましい。

## 【0004】

また、マイクロカプセルの製造には、マイクロカプセル壁材原料の性質等に応じて種々の方法が知られているが、特に医薬品等に使用し得るマイクロカプセルを製造するためには、壁材原料の有する生体適合性を損なわない方法である必要があり、従ってマイクロカプセル壁材原料もそのような方法を適用できる原料であることが要求される。

## 【0005】

一方、爪や毛髪、羊毛等の獣毛や羽毛中には構造タンパク質としてケラチンが存在するが、ケラチンそのものを壁材とするマイクロカプセル化は検討されていない。

わずかに関連技術として、ペプシン等のタンパク質分解酵素によるペプチド鎖の加水分解処理を経たケラチン(以下「ケラチン加水分解物」という。)を用いたマイクロカプセルが開示されている(特公昭 59-33017 号)。

しかし、該技術においては、タンパク質分解酵素による処理で一旦分解されたペプチド鎖の修復処理は何ら示されておらず、従って、該ケラチン加水分解物が鎖断片間のジスルフィド結合による架橋形成によってポリマー化してカプセル壁を構成した後も、切断された各ケラチン鎖は修復を受けないままであり、天然のケラチンを

microcapsule is developed with or other objective which improves stability and release characteristics other various property.

## 【0003】

Can produce microcapsule such as handling is easy in material substance which is used as wall material of micro capsule with simple equipment and method, it is something where chemical or other entrained amount microcapsule which is acquired for the quantity of capsule itself is large, it is sought.

Furthermore regarding microcapsule which is used for drug and the pesticide etc especially, it is superior in biocompatibility, you take and to divide without using crosslinking agent which becomes problem on toxicity it is something which can be produced, you can seek thing or other feature which possesses biodegradability.

For this, organism substance natural or is used with state which quite is close to this, as wall material starting material of microcapsule which it can use for the drug etc it is desirable.

## 【0004】

In addition, various methods is known in production of microcapsule according to property etc of microcapsule wall material starting material, but in order to produce microcapsule which it can use for especially drug etc, it is necessary to be a method which does not impair biocompatibility which wall material starting material has, it is a starting material to which therefore also microcapsule wall material starting material can apply that kind of method, it is required.

## 【0005】

On one hand, as structure protein keratin exists in fingernail and hair, wool or other animal fur and feather, but microencapsulation which designates keratin itself as the wall material is not examined.

Barely microcapsule which uses keratin (Below "keratin hydrolysate" with you say.) which passes hydrolysis of the peptide chain with pepsin or other protease as related technology, is disclosed, (Japan Examined Patent Publication Sho 59-33017 number).

But, as for rejuvenation treatment of peptide chain which with protease was once disassembled in treatment regarding said technology, what without being shown something which natural keratin regeneration is done, therefore, the said keratin hydrolysate with disulfide bond between chain fragment polymerization doing with the crosslink formation, after forming capsule wall, each keratin chain which is cut off

再生したものではない。

[0006]

【発明が解決しようとする課題】

かかる状況のもとで、本発明は、ペプチド結合の切断による低分子量化処理その他の非可逆的化学修飾を伴わない、再生天然ケラチンを壁材とする、生体適合性、生分解性の点で好ましい且つ薬剤等の含包量が大きいマイクロカプセル及びその製造方法を提供せんとするものである。

[0007]

【課題を解決するための手段】

上記課題の達成のため、本発明者は、ケラチン含有物質より、ペプチド結合の分解処理を経ることなく天然のケラチンを抽出してマイクロカプセルを製造する方法について種々検討した。

その結果、ケラチン含有物質から、タンパク質分解酵素による加水分解処理その他の非可逆的な変成を生ずる処理を施すことなく後述の方法によりケラチンを抽出して処理することにより、再生天然ケラチンよりなるマイクロカプセルを製造することに成功した。

また、該方法によって製造されるマイクロカプセルは、前述のケラチン加水分解物を用いた公知のマイクロカプセルと比較して、格段に優れた性質を有することが確認された。

[0008]

以下本発明を、マイクロカプセルの壁材原料として用いる水溶性ケラチンの製造段階[I]と、該水溶性ケラチンを用いてマイクロカプセルを製造する段階[II]とに分けて順次説明する。

[I.加水分解処理その他の非可逆的化学修飾を伴わないケラチン抽出方法及び結果]本段階は、ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤と共に攪拌することにより還元して可溶化・抽出し、得られた抽出液より不溶物を除去し、界面活性剤の存在下に透析その他の適当な手段で還元剤を除去することとを特徴とする。

[0009]

上記ケラチン含有物質としては、人毛、羊毛その他の獣毛、羽毛、ひづめ等、真正ケラチンを含有する物質ならいずれも使用することができる。

with/without receiving rejuvenation, is not.

[0006]

[Problems to be Solved by the Invention]

In origin of this condition, this invention with cutting of peptide bond molecular weight reduction does not accompany treatment other irreversible chemical modification, regeneration natural keratin is designated as wall material, it is desirable in biocompatibility, biodegradable point it is something which and it tries to offer microcapsule and its manufacturing method where chemical or other containing package quantity is large.

[0007]

[Means to Solve the Problems]

For achieving above-mentioned problem, extracting natural keratin from the keratin containing substance, without passing degradation process of peptide bond, various it examined this inventor, concerning method which produces microcapsule.

As a result, with from keratin containing substance, later mentioned method without administering treatment which with protease causes hydrolysis other irreversible metamorphoses extracting keratin it succeeded in producing the microcapsule which consists of regeneration natural keratin by treating.

In addition, microcapsule which is produced with said method by comparison with microcapsule of public knowledge which uses aforementioned keratin hydrolysate, has property which is superior markedly, it was verified.

[0008]

step which produces microcapsule below this invention, as wall material starting material of microcapsule production step of water solubility keratin which it uses [I] with, making use of said said water solubility keratin [II] with dividing, sequential you explain.

{keratin extraction method and result which do not accompany I. hydrolysis other irreversible chemical modification } keratin containing substance in in liquid medium reducing with reductant by agitating, the solubilizing \* it extracts this step, it removes insoluble matter from extracted liquid which is acquired, under existing of detergent with dialysis other suitable means reductant it is removed makes feature.

[0009]

As above-mentioned keratin containing substance, you can use, also substance habit gap which such as human hair, wool contains genuine keratin other animal fur, feather, hooves.

## [0010]

上記液体媒体としては、例えば、還元に対して安定であり且つケラチン含有物質に対し親和性のある溶媒を使用することができ、例えば水又はアルコール類若しくはアミド類等やこれらの混合物が好ましく用いられる。

該液体媒体の使用量は、ケラチン含有物質を浸漬できる量であればよいが、ケラチン含有物質の使用量の10乃至40重量倍であることが処理上好ましい。

## [0011]

上記液体媒体には、必須ではないが、特に獣毛、毛髪、角、爪、ひづめ等の可溶化しにくい材料の還元可溶化の効率を高める目的で所望により尿素、チオ尿素等の水素結合切断剤、メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール類、塩化亜鉛、ヨウ化ナトリウム、臭化リチウム等の無機塩類、アンモニア、水酸化ナトリウム等を溶解補助剤として加えることもできる。

これら溶解補助剤の添加量は適宜であるが、例えば尿素の場合、ケラチン含有物質に対して通常3乃至15重量倍、好ましくは5乃至12重量倍である。

## [0012]

上記還元にはケラチン含有物質中に存在するケラチンのジスルフィド結合をチオール基に還元し得る還元剤なら一般に用いることができるが、例えばメルカプトエタノール、チオグリコール酸、トルエン- $\omega$ -チオール、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール等のチオール系誘導体、トリフェニルホスフィン、トリプロピルホスフィン、トリブチルホスフィン等のリン含有化合物、亜硫酸水素ナトリウム等の無機還元性化合物などが好ましく用いられる。

還元剤の使用量は、ケラチン含有物質10gに対して0.01乃至0.50モルとするのが好ましく、0.05乃至0.25モルとするのが更に好ましい。

## [0013]

還元可溶化は、反応を促進するためにはアルカリ性側で行うのが好ましいが、その場合は通常pH10乃至11の範囲とするのが特に好ましい。

反応は所望により加熱して行う。

反応温度、反応時間はケラチン含有物質の可溶化の難易に応じて適宜設定することができるが、例えば室温乃至100 deg Cにて1乃至24

## [0010]

As above-mentioned liquid medium, vis-a-vis for example reduction uses solvent which has affinity vis-a-vis and keratin containing substance in stability to be possible, for example water or alcohol or amides etc and it can use these mixture desirably.

amount used of said liquid medium if a quantity which can soak keratin containing substance it should have been, but they are 10 to 40 weight multiple of amount used of keratin containing substance, in regard to treatment it is desirable.

## [0011]

It is not necessary in above-mentioned liquid medium. Especially, it is possible also to add hydrogen bond cutting agent, methanol, ethanol, propanol or other alcohols, zinc chloride, sodium iodide, lithium bromide or other inorganic salts, ammonia, sodium hydroxide etc of urea, thiourea with objective which raises efficiency of reduction solubilizing of material which fingernail, hoof or other solubilizing it is difficult to do animal fur, hair, angle and with desire as solubilizer.

addition quantity of these solubilizer is appropriate, but in case of for example urea, they are usually 3 to 15 weight multiple, preferably 5 to 12 weight multiples vis-a-vis keratin containing substance.

## [0012]

reductant which can reduce disulfide bond of keratin which exists in the keratin containing substance in thiol group if you can use for above-mentioned reduction generally, but for example mercaptoethanol, thioglycolic acid, toluene- $\omega$ -thiol, dithiothreitol, dithio-erythritol or other thiol it can use derivative, triphenyl phosphine, tripropyl phosphine, tributyl phosphine or other phosphorus-containing compound, sodium hydrogen sulfite or other inorganic reducing compound etc desirably.

As for amount used of reductant, it is desirable to make 0.01 to 0.50 mole, vis-a-vis keratin containing substance 10g furthermore it is desirable to make 0.05 to 0.25 mole.

## [0013]

As for reduction solubilizing, in order to promote reaction, it is undesirable to do with alkaline side, but in that case especially it is undesirable usually to make range of pH 10 to 11.

Reaction does heating with desire.

It can set appropriately according to hardness of solubilizing of the keratin containing substance, but, 1 to 24 hours it can agitate reaction temperature, reaction time with for example



時間攪拌することができる。

## [0014]

還元剤の除去の操作中に液体媒体中に存在させる必要のある前記界面活性剤は、通常、ケラチン含有物質を還元可溶化して得た溶液とした後であって、遠心分離、濾過等により不溶物を除去して透析工程を開始するまでの間に該溶液に加える。

該界面活性剤としては、例えば、(1)アニオン性界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム等のアルキル硫酸塩、アルキル硫酸エステル塩又は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩等の硫酸エステル塩、脂肪酸アルコールリン酸エステル塩、スルホコハク酸エステル塩又はナフタレンスルホン酸のホルマリン縮合物等、(2)両性界面活性剤として、ベタイン系界面活性剤等、(3)非イオン性界面活性剤として、ポリオキシエチレンアルキルエーテル型、脂肪酸エステル型、ポリエチレンイミン型、ポリグリセリンエーテル型、エステル型等、(4)カチオン性界面活性剤として4級アンモニウム塩を使用することができる。

これらのうち、特にアニオン性界面活性剤が好ましい。

界面活性剤の添加により、続く透析等による還元剤除去に際し濁りや沈澱の生ずることが防止され、脱塩精製されたケラチン溶液を得ることが可能となる。

## [0015]

上記界面活性剤の添加量は、ケラチン溶液の濃度や原料としたケラチン含有物質の種類によって異なり得るため、必ずしも限定されないが、通常例えば 0.01 乃至 5 重量%、好ましくは 0.1 乃至 2 重量%である。

## [0016]

還元剤の除去は、透析、電気透析、限外濾過等の適宜の手段によって行い、過剰の界面活性剤が除去されるまで行うことができる。

透析外液は例えばイオン交換水とすることができる。

また透析外液に還元剤(チオール基のジスルフィド結合への変換を防止できる還元剤)を少量(例えば、2-メルカプトエタノールの場合 0.1 乃至 0.5%)加えておけば、透析中におけるケラチン鎖のチオール基の再酸化によるケラチン鎖の再結合を防止することができる。

room temperature to 100 deg C.

## [0014]

Usually, reduction solubilizing doing keratin containing substance, after making solution which it acquires, removing insoluble matter with centrifugal separation, filtration, etc until it starts dialysis step, it adds aforementioned detergent where it is necessary while operating removal of reductant to exist in the liquid medium, to said solution between.

As said detergent, quaternary ammonium salt can be used as for example (1) anionic surfactant, as (2) amphoteric surfactant such as formalin condensate of sodium dodecyl sulfate or other alkyl sulfonate, alkyl sulfuric acid ester salt or polyoxyethylene alkyl ether sulfate or other sulfuric acid ester salt, aliphatic acid alcohol phosphoric acid ester salt, sulfosuccinic acid ester salt or naphthalene sulfonic acid, as (3) nonionic surfactant such as betaine surfactant, as (4) cationic surfactant such as polyoxyethylene alkyl ether type, fatty acid ester type, polyethylene imine type and polyglycerine ether type, ester type.

Among these, especially anionic surfactant is desirable.

With addition of detergent, turbidity and precipitation it occurs with such as dialysis which continues at time of reductant removal it is prevented, desalting it obtains keratin solution which was refined, it becomes possible.

## [0015]

addition quantity of above-mentioned detergent is not always limited in order to be possible to differ with kind of keratin containing substance which is made the concentration and starting material of keratin solution. It is for example 0.01 to 5 weight%, preferably 0.1 to 2 wt% usually.

## [0016]

Until it removes reductant, with dialysis, electrodialysis, ultrafiltration or other appropriate means, the detergent of excess is removed, it does, it is possible.

It can designate liquid outside dialysis as for example deionized water.

In addition if reductant (reductant which can prevent conversion to disulfide bond of thiol group) trace (In case of for example 2-mercaptoethanol 0.1 to 0.5%) is added to liquid outside dialysis, recombination of keratin chain can be prevented with the re-oxidation of thiol group of keratin chain in in dialysis.

従って、透析中に酸素その他の酸化剤の共存が考えられる場合には、還元剤を少量添加することが通常好ましい。

## 【0017】

脱塩精製して得られたケラチン水溶液はそのまま、又は限外濾過等により適宜濃度を調整して、或いは使用時まで凍結乾燥その他により一旦乾燥品として保存した後に再度水に溶解して、続くマイクロカプセル化の段階において使用することができる。

該水溶性ケラチンは凍結乾燥その他により乾燥させた後も水溶性であり、アミノ酸 100 残基当たりシステイン 1 乃至 5 個、シスチン 0.5 乃至 3 個を含み、平均分子量 30000 乃至 70000 である。

## 【0018】

また、上記において使用する界面活性剤は、還元可溶化の後で添加する代わりに還元可溶化に際して添加しておけば、還元可溶化を促進して収率及び抽出速度の双方を高めることが見出された。

従って、還元可溶化を一層効率よく行うためには、界面活性剤の存在下において還元可溶化を行うことがより好ましい。

また、これに用いる界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤が特に好ましい。

かかる方法によれば、典型的には、還元可溶化の後で界面活性剤を加える場合に比べて収率は約 10 乃至 20% 増大し、抽出速度は約 20 乃至 70% 増大する。

## 【0019】

この場合、液体媒体としては、上述のもののうち、例えば水性溶媒、例えば水又は水とメタノール、エタノール等の水混和性の有機溶媒との混合物を使用するのが特に好ましい。

また、界面活性剤存在下での還元可溶化では、反応は十分に促進されているため、通常、反応液の pH をアルカリ性側に特に調整することなく還元可溶化を行う。

その他反応条件は界面活性剤を還元可溶化の後に加える場合と同様でよい。

## 【0020】

界面活性剤の存在下に還元可溶化して得られる水溶性ケラチンについても分析を行い、アミノ酸分析でアミノ酸 100 残基当たりシステインを通常 4~10 個、シスチンを通常 0.5~2 個を有するこ

Therefore, when in dialysis you can think coexistence of oxygen other oxidant, reductant trace addition is done, usually it is desirable.

## 【0017】

desalting refining, that way, adjusting as needed concentration or with ultrafiltration, etc, or to when using after retaining, with lyophilizing in addition once as dry product melting in water for second time, you can use keratin aqueous solution which it acquires in step of microencapsulation which continues.

said water solubility keratin also rear of drying with water solubility, per amino acid 100 residue cysteine 1 to 5, including cystine 0.5 to 3 due to lyophilizing in addition, its average molecular weight 30000 to 70000.

## 【0018】

In addition, if detergent which is used in description above adds instead of adding after reduction solubilizing in case of reduction solubilizing, promoting reduction solubilizing, it raises both parties of the yield and extraction rate, it was discovered.

Therefore, in order to do reduction solubilizing more efficiently, the reduction solubilizing is done in under existing of detergent it is more desirable.

In addition, sodium dodecyl sulfate or other anionic surfactant especially is desirable as detergent which is used for this.

According to this method, when detergent is added after reduction solubilizing, comparing, approximately 10 to 20% it increases yield in the typical, approximately 20 to 70% increases extraction rate.

## 【0019】

In this case, among above-mentioned ones, especially it is desirable as liquid medium, to use mixture of for example aqueous solvent, for example water or water and the organic solvent of methanol, ethanol or other water miscibility.

In addition, with reduction solubilizing under detergent existing, as for reaction because it is promoted to fully, reduction solubilizing is done usually, pH of reaction mixture without especially adjusting the alkaline side.

In addition reaction condition may be similar to case where detergent is added after reduction solubilizing.

## 【0020】

Reduction solubilizing doing under existing of detergent, you analyze concerning water solubility keratin which is acquired, per amino acid 100 residue cysteine usually 4-10, cystine possess usually 0.5-2 with amino acid analysis, and, protein

と、及び、電気泳動分析で分子量 15000~130000 のタンパク質を主成分とすることが確認された。

[0021]

なお、還元可溶化反応は超音波照射の下に行うこともできる。

超音波照射は、界面活性剤存在下での還元可溶化反応において高められたケラチン収率をも更に高め(例えば、牛角で 45%から 55%へと高め)、且つ、同等以上の収率を得るために要する反応時間を短縮する(例えば牛角で 24 時間から 8 時間へと短縮する)効果を有する。

従って、還元可溶化に際し、超音波照射下に行うことが更に有利である。

超音波照射は適宜の超音波照射装置を用いて行うことができ、出力は適宜設定できるが、反応液 1L に対して例えば 50 乃至 200W とすることができる。

[0022]

以下に、水溶性ケラチンの製造例を記す。

{水溶性ケラチン製造例 1} 羊毛(化炭ノイル)20g を、0.8M チオグリコール酸カリウム水溶液(pH10.5)300mL に浸漬し、5 deg C で 36 時間攪拌を行った。

反応物から不溶物を濾過により除去し、イオン交換水で 600mL に希釈した。

この液にドデシル硫酸ナトリウム(SDS)10g を加えて溶解し、セロファンチューブに入れてイオン交換水(10L)に対して 2 回透析し、無色透明のケラチン水溶液(650mL)を得た。

[0023]

Lowry 法によりこの溶液のタンパク質定量を行ったところ、ケラチン濃度は 1.2%であった。

また、該水溶液を凍結乾燥して得たケラチン粉末のアミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸 100 残基当たりシステインが 3.3 個、シスチンが 1.2 個であった。

また、ポリアクリルアミド-SDS 電気泳動法によれば、分子量 30000 乃至 70000 のタンパク質が主成分であった。

[0024]

{水溶性ケラチン製造例 2} 脱脂羊毛(メリノ種)10g、ドデシル硫酸ナトリウム 6.0g、亜硫酸水

of molecular weight 15000~130000 is designated as main component with electrophoresis analysis, it was verified.

[0021]

Furthermore, reduction solubilizing reaction can also do under ultrasound irradiation.

As for ultrasound irradiation, under detergent existing also keratin yield which is raised at time of reduction solubilizing reacting furthermore is raised and (In for example cattle angle from 45% to 55% raising), at same time, (In for example cattle angle it shortens to with 8 -hour from 24 hours.) effect which shortens reaction time which is required in order to obtain yield of same or greater possesses.

Therefore, in case of reduction solubilizing, it does under ultrasound irradiation, furthermore it is profitable.

It does ultrasound irradiation making use of appropriate ultrasound irradiation device it to be possible, it can set output appropriately, it can make the for example 50 to 200W, but vis-a-vis reaction mixture 1L.

[0022]

Below, Production Example of water solubility keratin is inscribed.

{water solubility keratin Production Example 1} wool (Carbonizing no yl) 20 g 0.8 M thioglycolic acid potassium aqueous solution (pH 10.5) were soaked in 300 ml, 36 hours churning were done with 5 deg C.

It removed insoluble matter from reaction product with filtration, with deionized water diluted in 600 ml.

It melted in this liquid sodium dodecyl sulfate (SD S) including 10 g, inserted in cellophane tube and twice dialysis it did vis-a-vis deionized water (10 L), acquired the keratin aqueous solution (650 ml) of colorless and transparent.

[0023]

When protein quantification of this solution was done with Lowry method, keratin concentration was 1.2%.

In addition, lyophilizing doing said aqueous solution, when it did amino acid analysis of the keratin powder which it acquires, per amino acid 100 residue cysteine was 3.3, cystine 1.2.

In addition, according to polyacrylamide-SD Selectrophoresis, protein of molecular weight 3000 0 to 7 0000 was the main component.

[0024]

{water solubility keratin Production Example 2} degreasing wool (jp9 no kind) mixed solution of urea 300 ml of 10 g,

素ナトリウム 16g 及び 8 モル濃度の尿素 300mL の混合液を密栓のうえ、50 乃至 55 deg C にて 1 時間、浴槽型超音波装置にて処理した。

不溶物を濾過して除去し、濾液をセロファンチューブに入れ、外液として 0.2 重量%亜硫酸水素ナトリウム水溶液(3L)を用いて透析した。

透析物より少量の不溶物を遠心により除いて得られた無色透明の水溶液約 330mL はケラチンを 1.4 重量%含有していた(Lowry 法によるタンパク質分析による)。

またこのケラチンはアミノ酸分析により、アミノ酸 100 残基当たりシステイン 7.6 個、シスチン 0.8 個を有しており、ポリアクリルアミド-SDS 電気泳動によれば、分子量約 40000 及び 60000 のタンパク質(それぞれ 3 乃至 4 割、5 乃至 6 割)を主成分としていた。

[0025]

〔II.本発明におけるマイクロカプセルの製造方法及び得られるマイクロカプセルの特徴〕上記で得られる水溶性ケラチンを用いて再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルを製造する方法、及びそれによって得られるマイクロカプセルの特徴を以下に説明する。

上記で得られるケラチン水溶液をそのまま、又は限外濾過等により濃度を適宜調整し、或いは凍結乾燥等により一旦乾燥させたものを再度水溶液として、以下の工程で使用することができる。

[0026]

なお、上記で得られた水溶性ケラチンは、タンパク質分解酵素等によるペプチド鎖切断処理を経ていないため、ケラチン加水分解物に比して膜の形成能が著しく高く(試験例 1 を参照)、マイクロカプセルの効率的な製造には格段に有利である。

しかも、上記で得られる水溶性ケラチンより製造されるマイクロカプセルは、ケラチン加水分解物から製造されるマイクロカプセルに比して格段に優れた安定性を有する(比較例 1 を参照)。

[0027]

また、上記で得られた水溶性ケラチンよりマイクロカプセルを製造するためには、例えば、相分離法、噴霧凝固造粒法その他マイクロカプセル

sodium dodecyl sulfate 6.0g、sodium hydrogen sulfite 16g and 8 mole concentration on the plugging, with 50 to 55 deg C was treated with 1 hour、bath type ultrasound equipment.

Filtering insoluble matter, it removed, inserted filtrate in cellophane tube, the dialysis it did making use of 0.2 wt% sodium hydrogen sulfite aqueous solution (3 L) as outside liquid.

aqueous solution approximately 330 ml of colorless and transparent which is acquired the insoluble matter of trace from dialysate due to centrifugation excluding 1.4 weight% contained keratin, (With Lowry method with protein analysis).

In addition per amino acid 100 residue cysteine 7.6、cystine 0.8 we had possessed this keratin with the amino acid analysis, according to polyacrylamide-SD Selectrophoresis, molecular weight approximately we designated protein (Respectively 3 to 40%、5 to 6 percentages) of 40000 and 60000 as main component.

[0025]

Method of producing microcapsule which designates regeneration natural keratin as the wall material making use of water solubility keratin which is acquired with {manufacturing method of microcapsule in II. this invention and feature of microcapsule which isacquired} descriptionabove. And feature of microcapsule which is acquired with that is explainedbelow.

keratin aqueous solution which is acquired with description above that way, or with ultrafiltration etc those which are dried once or with lyophilizing etc as the aqueous solution for second time concentration appropriately you can adjust,with, with step below you can use.

[0026]

Furthermore, as for water solubility keratin which is acquired at description above,because it is not passing by peptide chain cutting treatment with such as protease, comparing to keratin hydrolysate, forming ability of film considerablyhighly (You refer to Test Example 1), it is markedly profitable in effective production of microcapsule.

Furthermore, from water solubility keratin which is acquired with description above microcapsule which is produced, comparing to microcapsule which is producedfrom keratin hydrolysate, it possesses stability which is superior markedly (You refer to Comparative Example 1).

[0027]

In addition, in order to produce microcapsule from water solubility keratin which isacquired at description above, it is possible also, even with the any method, in stability can

の製造方法として知られている種々の方法のいずれを用いることもでき、いずれの方法でも、安定で生体適合性の点で好ましいマイクロカプセルが容易に製造できる。

なお、とりわけ微細かつ均一な粒径を有しかプセル壁が極めて薄く且つ安定性が高い、という特段の特徴を備えたマイクロカプセルの製造を目的とする場合には、後述の超音波法が、極めて簡便にこの目的の達成を可能にするから、特に好ましい。

[0028]

[1.好ましい各方法の概要]以下(1)乃至(4)に本発明のマイクロカプセルの各種製造方法のうち、好ましい主要なものの概要を示す。

[0029]

(1)超音波照射法: ケラチン水溶液と、水に不溶性又は難溶性の有機溶媒等(例えばトルエン、ヘキサン等の有機溶媒又は油状の薬物等)との混合物(ケラチン水溶液/有機溶媒等の体積比は当該マイクロカプセルの製造目的に応じて変化するが、通常 0.1 乃至 10)を、例えば 0 deg C 乃至 50 deg C の温度範囲にて、例えば 10 秒乃至 10 分間超音波照射する。

ケラチンのアミノ酸残基のうちシステイン残基が有するメルカプト基がジスルフィド結合へと変化することによってケラチン鎖間に架橋形成がなされる結果、水溶性のケラチンが水に不溶の再生天然ケラチンとなって前記溶媒等の微細な粒子表面上に極めて薄い安定な皮膜を形成し、当該溶媒等を芯物質として効率的に閉じ込めてなる均一な粒径のマイクロカプセルが得られる(実施例 3 及び 4 を参照)。

[0030]

(2)振動・攪拌法: 上記(1)の混合物(ケラチン水溶液及び溶媒の)に過酸化水素、過ヨウ素酸ナトリウムなど SH 基を酸化してジスルフィド結合に変換することのできる酸化剤を加えた後、ポルテックスミキサーや攪拌モーターなどで激しく振動・攪拌する。

超音波法と同様な簡便な操作で、再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルが製造できる(実施例 5 を参照)。

[0031]

produce desirable microcapsule easily in the point of biocompatibility to use which of various methods which is known for example phase separation method, atomization solidification granulating method in addition as manufacturing method of microcapsule.

Furthermore, especially to possess fine and uniform particle diameter, when production of microcapsule which has feature of special step that capsule wall quite to be thin and stability is high, is designated as the objective, because later mentioned ultrasound method, quite makes achievement of this objective simply possible, especially it is desirable.

[0028]

Among various manufacturing method of microcapsule of this invention, gist of desirable principal ones is shown in (1) through (4) below (1. gist of desirable each method).

[0029]

(1) ultrasound irradiation method: keratin aqueous solution and (drug etc of for example toluene, hexane or other organic solvent or oily) with mixture (keratin aqueous solution/organic solvent or other volume ratio changes according to manufacturing objective of this said microcapsule, but usually 0.1 or 10) such as insolubility or organic solvent of poorly soluble, with temperature range of for example 0 deg C to 50 deg C, for example 10 second to 10 min ultrasound irradiation is done in the water.

mercapto group which inside cysteine residue of amino acid residue of keratin has resultant water soluble keratin which can do crosslink formation between keratin chains it changes with to with disulfide bond becoming regeneration natural keratin of insoluble in water, quite thin stability film is formed on the aforementioned solvent or other microscopic particle surface, shutting in in efficient with this said solvent etc as core substance, microcapsule of uniform particle diameter which becomes is acquired (You refer to Working Example 3 and 4).

[0030]

oxidation doing SH group such as hydrogen peroxide, sodium periodate in mixture (keratin aqueous solution and solvent) of (2) vibrating \* stirring method: above-mentioned (1), after adding oxidant which can convert to disulfide bond, to be extreme it vibrates & agitates with such as vortex mixer and stirring motor.

With simple operation which is similar to ultrasound method, it can produce microcapsule which designates regeneration natural keratin as wall material (You refer to Working Example 5).

[0031]

(3)上記二方法の変法: 上記(1)の混合物を、窒素ガスなど酸化能力を欠くガス雰囲気下にて、超音波照射装置、ボルテックスミキサーや攪拌モーターなどで激しく振動・攪拌して乳濁液とした上で、上記(2)で述べた酸化剤を加えて攪拌する方法(実施例 6 を参照)。

【0032】

(4)他の壁材成分を加えた方法: ケラチン水溶液と他のタンパク質水溶液の混合物、又はケラチン水溶液と非タンパク質で SH 基もしくはジスルフィド結合を持つ化合物の水溶液との混合物を壁材原料として用い、上記(1)乃至(3)に記載の方法で処理して再生天然ケラチンを壁材として含むマイクロカプセルを製造する(実施例 7 及び 8)。

混合する他成分に応じて、得られるマイクロカプセルの性質を変化させることが可能となる。

【0033】

上記(1)乃至(4)において、あらかじめ有機溶媒等に染料、香料、医薬品などの物質を溶かしたものを使用すれば、これらは芯物質として効率よくマイクロカプセル内に含まれる(実施例 8 及び 9)。

【0034】

[2.公知成分]以下に本発明のマイクロカプセルの製造に用いる公知成分について詳細に説明する。

(i)ケラチン含有水溶液: 下記のケラチン水溶液(i-a)単独、該ケラチン水溶液(i-a)に以下の(i-b)若しくは(i-c)に記載の物質を加えた混合物、又は該ケラチン水溶液(i-a)に(i-b)と(i-c)とを加えた混合物である。

【0035】

(i-a)ケラチン水溶液: ケラチン原料として羊毛、人髪、鶏羽、犬毛、牛角などケラチンを含むものを用いて上記の方法で製造したケラチンの水溶液である。

【0036】

(i-b)ケラチン水溶液と混合される他のタンパク質またはペプチド: コラーゲン、ゼラチン、フィブリノーゲン、シルク、卵白リゾチーム、インスリンなどのメルカプト基やジスルフィド結合を有するタ

oxidizing capability under gas atmosphere which such as nitrogen gas lacks, ultrasound irradiation device, to be extreme vibrating & agitating with such as vortex mixer and stirring motor the mixture of modified method: above-mentioned (1) of (3) above-mentioned two method, after making emulsion, method which it agitates including oxidant which you express with above-mentioned (2) (You refer to Working Example 6).

【0032】

mixture, or keratin aqueous solution of method: keratin aqueous solution and other protein aqueous solution which add the (4) other wall material component and it uses mixture of aqueous solution of compound which has SH group or disulfide bond with non-protein as wall material starting material, treating with method which is stated in above-mentioned (1) through (3), it produces microcapsule which includes regeneration natural keratin as wall material (Working Example 7 and 8).

property of microcapsule which is acquired according to other component which it mixes, it changes it becomes possible.

【0033】

In above-mentioned (1) through (4), if beforehand dye, perfume, those which melted drug or other substance are used for organic solvent etc, these to be efficient containing package are done inside microcapsule as the core substance, (Working Examples 8 and 9).

【0034】

You explain in detail concerning public knowledge component which is used for the production of microcapsule of this invention below {2. public knowledge component}.

Below (i-b) or it is a mixture, which adds substance which is stated in the (i-c) or a mixture which (i-b) with adds (i-c) to said keratin aqueous solution (i-a) in (i) keratin-containing aqueous solution: below-mentioned keratin aqueous solution (i-a) alone, said keratin aqueous solution (i-a).

【0035】

As (i-a) keratin aqueous solution: keratin starting material it is a aqueous solution of keratin which is produced with the above-mentioned method making use of keratin those which such as wool, human hair, chicken feather and dog wool, cattle angle include.

【0036】

protein; glycyl-glycyl-cysteine which possesses other protein or peptide: collagen, gelatin, fibrinogen, silk, egg white lysozyme, insulin or other mercapto group and disulfide bond which (i-b) keratin aqueous solution are mixed

ンパク質;グリシル-グリシル-システイン (Gly-Gly-Cys)や(グリシル-グリシル-システイン)<sub>2</sub> [(Gly-Gly-Cyt)<sub>2</sub>]などのペプチド。

またはこれらに存在する複数のジスルフィド結合の全部または一部が還元されてメルカプト基となっているもの。

[0037]

(i-c)非タンパク質でメルカプト基またはジスルフィド基を持つもの:SH 基を担持せしめたポリビニルアルコール(例:平均分子量 2000 に対して SH 基が 1 乃至 20 個)などの高分子の水溶液、およびグルタチオン、2-メルカプトエタノールなど。

[0038]

(ii)有機溶媒等:本発明に使用する有機溶媒としては、水に難溶なトルエン、キシレン、ヘキサン、デカン、シクロヘキサンなどの炭化水素系溶媒が最も好ましいが、ジエチルエーテルなどのエーテル型溶媒やフルオロシクロヘキサン、フロン 113 などの含ハロゲン炭化水素も使用できる。

しかし、これらに限るものではなく、水に溶解性の低い溶媒であれば使用することができる。

また、溶媒に限らず、水に不溶性又は難溶性のその他の液状物質、例えばビタミン E アセテートその他の油状の薬物等も使用することができる。

[0039]

(iii)酸化剤:酸化剤を使用する場合には、空気、酸素、過酸化水素、過ヨウ素酸ナトリウム、過臭素酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム、ヨウ素酸カリウムなどの、メルカプト基をジスルフィド結合に酸化し得るものを用いるのが好ましい。

また、これら酸化剤と共に、酸化促進剤または触媒として、例えば鉄イオン、を併用することもできる。

[0040]

[3.マイクロカプセル形成の具体的方法例]マイクロカプセルを形成させるための方法としては、以下の通り、既知のマイクロカプセル製造方法が種々使用できるが、粒径が微細且つ均一でありカプセル壁が極めて薄く且つ安定性が高いマイクロカプセルを簡便に製造することができるという点で、超音波法が特に好ましい。

[0041]

(3-i)超音波法:超音波照射装置は試料に超音波を照射することができる装置であればいずれ

(Gly-Gly-Cys) and (glycyl-glycyl-cystine) <sub>2</sub> {(Gly-Gly-Cyt) <sub>2</sub> } or other peptide.

Or all or part of disulfide bond of multiple which exists in these being reduced, those which become mercapto group.

[0037]

(i-c) With non-protein mercapto group or aqueous solution, and glutathione, 2-mercaptoethanol etc of the polyvinyl alcohol (Vis-a-vis example: average molecular weight 2000 SH group 1 to 20) or other polymer which thing: SH group which has disulfide group bearing is done.

[0038]

poorly soluble toluene, xylene, hexane, decane, cyclohexane or other hydrocarbon solvent is most desirable in water, as organic solvent which such as (ii) organic solvent for the: this invention is used, but you can use also diethyl ether or other ether type solvent and the fluoro cyclohexane, freon 113 or other halogen containing hydrocarbon.

But, it is not something which is limited to these and if it is a solvent where solubility is low in water, you can use.

In addition, other you can use also drug etc of liquid substance, for example vitamin E acetate other oily of insolubility or poorly soluble for water not just solvent.

[0039]

When (iii) oxidant: oxidant is used, air, oxygen, hydrogen peroxide, sodium periodate, perbromic acid sodium, ammonium persulfate, iodic acid potassium or other, mercapto group it is desirable in disulfide bond to use those which oxidation it can do.

In addition, it is possible also to jointly use for example iron ion, with these oxidant, as oxidation promoter or catalyst.

[0040]

As follows, various you can use known microcapsule production method as method in order to form {Concrete method example of 3. microcapsule formation} microcapsule, but in point that, ultrasound method especially is desirable particle diameter capsule wall quite to be thin and it can produce microcapsule where stability is high simply with fine and uniform.

[0041]

(3-i) ultrasound method: ultrasound irradiation device if it is a equipment which can irradiate ultrasound to sample, is good

の装置でもよいが、マイクロカプセルの生成効率を高めるには、チタンなど金属のプローブ先端より超音波を発生させるプローブ型の装置が好ましい。

超音波照射条件は、試料の成分と体積により適宜調製するが、一般にケラチン含有水溶液と有機溶媒等の合計体積の 10mL に対し、30 乃至 50W にて 10 秒間乃至 5 分間照射すればよい。

## [0042]

なお、含ハロゲン炭化水素などを有機溶媒として用いると、マイクロカプセルの生成効率と含包効率が低くなる場合があるが、その場合には、超音波処理に先立って微量の過酸化水素などの酸化剤を添加しておけば、マイクロカプセルの生成効率を増加させることができる。

## [0043]

また、窒素ガスなど酸化能力を欠く気体の雰囲気下にて超音波処理し、生じた乳濁液の混合物に酸化剤を加えてもよい。

この手法は、芯物質が酸化されやすい場合には、芯物質の酸化を防ぎつつマイクロカプセル化する効果があり、特に有用である。

酸化剤の使用料はおおむね原料中の SH 基 1 個に対し 1 乃至 6 倍の酸化剤分子の個数に相当する量である。

## [0044]

ケラチンとケラチン以外の壁材原料〔上記 2. の (i-b) 及び (i-c)〕の混合比は、ケラチンに対して 1 乃至 500 重量%用いることができるが、例えば、コラーゲンやゼラチン、フィブリノーゲンでは 30 乃至 500 重量%、シルクでは 1 乃至 100 重量%、SH 基担持ポリビニルアルコールでは 10 乃至 200 重量%を用いる。

有機溶媒量は、芯物質の溶解性に応じて変わるが、ケラチンと上記壁材原料の水溶液全量に対して 0.1 乃至 5 倍体積、通常は 0.5 乃至 2 倍体積を使用する。

## [0045]

(3-ii) 攪拌法: 壁材原料は超音波法と同様であるが、超音波操作の代わりにボルテックスミキサーで激しく振動させつつ攪拌するか、又は攪拌モーターにより激しく攪拌する。

any equipment, but to raise production efficiency of microcapsule, such as titanium generates ultrasound equipment of probe type which is desirable from probe tip of metal.

As for ultrasound irradiation condition, it manufactures appropriately with component and volume of sample, if, but generally vis-a-vis 10 ml of keratin-containing aqueous solution and organic solvent or other total volume, with 30 to 50W 10 second to 5 min it should have irradiated.

## [0042]

Furthermore, halogen containing hydrocarbon etc when it uses, as organic solvent there are times when production efficiency and containing package efficiency of microcapsule become low but, in that case, preceding ultrasonic treatment, if it adds hydrogen peroxide or other oxidant of trace amount, production efficiency of microcapsule it can increase.

## [0043]

In addition, ultrasonic treatment it does oxidizing capability under atmosphere of gas which such as nitrogen gas lacks in mixture of emulsion which it occurs including oxidant it is good.

As for this technique, when core substance oxidation it is easy to be done, while preventing oxidation of core substance, is an effect which microencapsulation is done, especially it is useful.

used material of oxidant is quantity which is suitable to number of oxidant molecule of 1 to 6 time vis-a-vis SH group 1 in starting material in general.

## [0044]

1 to 500 weight% you can use proportion of wall material starting material (Description above 2. (i-b) And (i-c)) other than keratin and keratin, vis-a-vis keratin, but with for example collagen and gelatin, fibrinogen with 30 to 500 weight%, silk with 1 to 100 weight%, SH group bearing polyvinyl alcohol 10 to 200 weight% are used.

organic solvent amount changes according to solubility of core substance, but 0.1 to 5 times volume, usually 0.5 to 2-fold volume are used vis-a-vis aqueous solution total amount of keratin and the above-mentioned wall material starting material.

## [0045]

(3-ii) stirring method: wall material starting material it is similar to ultrasound method, but while in place of ultrasound operation vibrating extremely with vortex mixer, it agitates, or it agitates extremely due to stirring motor.



なお、処理前に酸化剤を微量(SH基1個に対し1乃至6倍の酸化剤分子個数)加えておくか、攪拌して生じた乳濁状の混合物に酸化剤を加え、その後、酸化剤がよく混ざるよう軽く攪拌してもよい。

【0046】

(3-iii)pH調製による方法: 芯物質たる前記有機溶媒等をケラチン水溶液中に分散させ、これにクエン酸、酢酸等の酸を加えてpHを4乃至5付近に調整する。

これにより、水溶性ケラチンは等電点に達して該芯物質を核にして凝集沈着しこれを包囲してマイクロカプセルの原型が形成される。

ついで空気、酸素その他の酸化剤を導入・添加することにより、水溶性ケラチンの各分子のメルカプト基同士が酸化されてジスルフィド結合を形成し高分子化して不溶性の被膜となり、マイクロカプセルが形成される。

【0047】

(3-iv)噴霧乾燥法: 水溶性又は水に不溶性の芯物質をケラチン水溶液中に溶解又は分散させ、これをスプレードライヤーで噴霧し、熱風と接触させ水分を蒸発させて乾燥させることにより、マイクロカプセルが形成される。

該方法は、水溶性及び水不溶性のいずれの物質をも芯物質としてマイクロカプセル化することができ、カプセル壁の不溶化も容易に行われるという利点を有する。

【0048】

(3-v)コアセルベートの形成による方法: pH5以上に調整したケラチン水溶液中にpHのいかにらず負に荷電しているポリアニオン、例えばアラビアゴムの水溶液を添加して希釈水溶液とし、これに水に難溶性又は不溶性の芯物質を分散させる。

この系に酢酸、クエン酸等の酸を添加してpHを低下させることにより、ケラチン分子の荷電のみを負から正に変化させ、芯物質を核にして水溶性ケラチンとポリアニオンとの複合コアセルベートの膜を形成させる。

次いで適宜酸化処理を行うことにより、この膜が水に不溶性となりマイクロカプセルが形成される。

かかる複合コアセルベートを形成し得るポリアニオンの他の例としては、アルギン酸ナトリウム、寒天、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルメチルエーテル無水マレイン酸共重合

Furthermore, trace amount (Vis-a-vis SH group 1 oxidant molecule number of 1 to 6 time) it adds oxidant before treating, oragitates and in order to mixture of suspension which it occurs afterthat, for oxidant to blend well including oxidant, it is possible to agitate loosely.

【0046】

Dispersing method: core substance barrel aforementioned organic solvent etc in keratin aqueous solution with(3-iii) pH adjustment, you adjust pH 4 to 5 vicinity in this including the citric acid, acetic acid or other acid.

Because of this, water solubility keratin reaching to isoelectric point, coheres settles with said core substance as nucleus and encircles this and original shape of microcapsule is formed.

Next, mercapto group of each molecule of water solubility keratin oxidation being done by introducing & adds air, oxygen other oxidant, it forms disulfide bond and the polymerization does and becomes insoluble coating, microcapsule is formed.

【0047】

In (3-iv) spray drying method: water solubility or water insoluble core substance in keratin aqueous solution melting or dispersing, or, atomization it does this with spray dryer, contacts with hot air and microcapsule is formed by evaporating, drying moisture.

microencapsulation it does said method, with water solubility and water insoluble each substance as core substance, it is possible, it possesses benefit that also insolubilization of capsule wall is done easily.

【0048】

In keratin aqueous solution which was adjusted method: pH 5 or greater with formation of (3-v) coacervate adding aqueous solution of poly anion, for example gum arabic which charge has been done innegative number with circumstance of pH, it makes the dilute aqueous solution, in this disperses poorly soluble or insoluble core substance in water.

Adding acetic acid, citric acid or other acid to this system, only charge of keratin molecule changing just from negative number pH by decreasing, it forms film of compound coacervate of water solubility keratin and poly anion with core substance as the nucleus.

Next, this film becomes insolubility in water and by doing as needed oxidation treatment, microcapsule is formed.

sodium alginate, agar, carboxymethyl cellulose, you can list polymer and detergent which etc such as polyvinyl methyl ether maleic anhydride copolymer, poly vinyl benzenesulfonic acid, formalin possess acid group in

体、ポリビニルベンゼンスルホン酸、ホルマリンとナフタレンスルホン酸との縮合物等、分子中に酸基を有するポリマーや界面活性剤等が挙げられる。

[0049]

また、ケラチン水溶液に芯物質を分散させ、これにアルコール等又は無機塩類を添加することによって、芯物質を核として単純コアセルベート又はソルトコアセルベートの膜を形成させることができ、これを適宜酸化処理して不溶化させることによりマイクロカプセルが形成される。

[0050]

[4. マイクロカプセルの単離] 上記(3-i)乃至(3-iii)、及び(3-v)で得られたマイクロカプセルの単離は次のように行うのが好ましい。

(4-i) 処理液をそのまま濃縮するか乾燥(凍結乾燥など)する。

[0051]

(4-ii) 処理液を遠心して、マイクロカプセルを分離分画する。

このままではマイクロカプセルの外部にマイクロカプセルの生成に与らなかった壁材原料や酸化剤などが不純物として残る場合があるため、また、マイクロカプセルを更に改質するため、マイクロカプセル画分に水や緩衝液を加えて攪拌後遠心し、再びマイクロカプセルを分離分画する。

この操作を数回繰り返した後、マイクロカプセル分散液をそのまま利用するか、濃縮または乾燥(凍結乾燥など)する。

[0052]

(4-iii) 処理液を、セロファン膜などの半透膜を利用して水や緩衝液あるいは香料、染料、生物活性薬物などを溶かした水溶液に対して、透析する。

透析後の液をそのまま利用するか、濃縮または乾燥(凍結乾燥など)する。

[0053]

以上により得られるマイクロカプセルの直径は、ケラチン含有水溶液の種類、ケラチン含有水溶液に対する有機溶媒の体積比、振動又は攪拌の与え方と時間などにより変動し一概に規定できないが、例えば、2.5重量%のケラチン水溶液とトルエンとの1:1体積混合物(20mL)を室温にて3分間、50Wにて超音波処理した場合は、1乃至3 $\mu$ mを主とした微小球であることが光散

molecule and condensate of naphthalene sulfonic acid as other example of poly anion which can form this compound coacervate.

[0049]

In addition, dispersing core substance to keratin aqueous solution, forms film of the simple coacervate or salt-coacervate in this alcohol etc or inorganic salts is added with, with core substance as nucleus to be possible, as needed oxidation treatment doing this, microcapsule is formed by insolubilization doing.

[0050]

(Isolation of 4. microcapsule) above-mentioned (3 -i) to (3 -iii), and as for isolation of microcapsule which is acquired with (3 -v) it is desirable to do following way.

It concentrates (4 -i) treatment solution that way, or dries (lyophilizing etc).

[0051]

centrifugation doing (4 -ii) treatment solution, separation fraction it does microcapsule.

Because this way in outside of microcapsule giving are not driven the wall material starting material and oxidant etc which there are times when it remains as the impurity in formation of microcapsule, in addition, in order furthermore to improve microcapsule, after stirring centrifugation it does in microcapsule fraction including water and buffer, separation fraction does microcapsule again.

several times after repeating this operation, it utilizes microcapsule dispersion that way, or it concentrates or dries (lyophilizing etc).

[0052]

dialysis it does vis-a-vis aqueous solution which melted water and the buffer or perfume and dye, biological activity medicine ones etc (4 -iii) treatment solution, making use of cellophane film or other semipermeable membrane.

It utilizes liquid after dialysis that way, or it concentrates or dries (With lyophilizing etc).

[0053]

diameter of microcapsule which is acquired by above fluctuates with the volume ratio, vibration of organic solvent for kind, keratin-containing aqueous solution of keratin-containing aqueous solution and or the way of imparting and time etc of churning rule is not possible unconditionally. When keratin aqueous solution of for example 2.5 weight% and 1:1 volume mixture (20 ml) of toluene with the room temperature ultrasonic treatment it does with 3 min, 50W, it

乱法により求められ、同サンプルを透過型電子顕微鏡で観察したところ、壁厚は約  $0.02 \mu\text{m}$  の極めて薄い、紙風船様の形態であった。

[0054]

【実施例】

次に実施例を挙げて更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例 1)

pH 調節によるマイクロカプセル化:

製造例 1 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.2 重量%)500mL 中に、ビタミン E アセテート 5g を均一に分散させ、攪拌しながらこれに 5%クエン酸水溶液を滴下して加え pH4 にてケラチンを凝集させ、分散したビタミン E アセテートの周囲にマイクロカプセルの原型を形成させた。

これを遠心分離により分離し、空気を吹き込んで乾燥しつつ空気酸化させ、更に減圧乾燥してマイクロカプセルを完成させた。

得られたマイクロカプセルは、pH のいかにに関わりなく 20 deg C の水に不溶であった。

[0055]

(実施例 2)

噴霧乾燥によるマイクロカプセル化:

製造例 1 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.2 重量%)500mL に、メチレンブルー 2g を加えて分散させ、これをスプレードライヤーで噴霧し、熱風を接触させて水分を蒸発、乾燥させることにより、メチレンブルーの周囲に水に不溶性のケラチンの被膜を形成させてマイクロカプセル化を行った。

[0056]

(実施例 3)

広口試験管に製造例 1 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.2 重量%)10mL とトルエン 10mL を加え、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25 deg C にて 50W の出力で 3 分間、超音波照射した。

生じた白色懸濁液を 3000 回転/分で 15 分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。

is a microsphere which makes 1 to 3  $\mu\text{m}$  main, it is sought by light scattering method, when same sample is observed with transmission electron microscope, wall thickness approximately  $0.02 \mu\text{m}$  quite is thin, it was a paper balloon way morphological form.

[0054]

[Working Example(s)]

Listing Working Example next, furthermore you explain in detail, but the this invention is not something which is limited in these.

(Working Example 1)

With pH adjustment microencapsulation:

keratin aqueous solution which is acquired with Production Example 1 (keratin concentration 1.2 wt%) in 500 ml, dispersing vitamin E acetate 5g to uniform, while agitating, dripping 5% citric acid aqueous solution to this, it added and it formed original shape of microcapsule in periphery of vitamin E acetate which cohering, disperses keratin with pH 4.

While separating this due to centrifugal separation, blowing air and drying air oxidation doing, furthermore reduced pressure drying doing, you completed microcapsule.

microcapsule which it acquires was insoluble in water of 20 deg C notto relate to circumstance of pH.

[0055]

(Working Example 2)

With spray drying microencapsulation:

keratin aqueous solution which is acquired with Production Example 1 (keratin concentration 1.2 wt%) to 500 ml, dispersing including methylene blue 2g, atomization it did this with spray dryer, hot air contacted and in periphery of methylene blue forming coating of insoluble keratin in water by evaporating and dries moisture, it did microencapsulation.

[0056]

(Working Example 3)

While with magnet bar agitating mixture to indirect keratin aqueous solution which in wide mouth test tube is acquired with Production Example 1 (keratin concentration 1.2 wt%) including 10 ml and the toluene 10 ml, with 25 deg C 3 min, ultrasound irradiation it did with output of 50 W.

15 min centrifugation it did white suspension which it occurs with 3000 rpm, separated clouding solid substance, after stirring, centrifugation it did in same way including the water (20 ml).

同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後凍結乾燥した。

得られた白色粉末状物質(約 0.10g)は、透過型電子顕微鏡観察によれば比較的均一なマイクロカプセルであり、壁厚約 0.02  $\mu$ m、直径 1.2 乃至 1.5  $\mu$ m であった。

白色粉末状物質の光散乱測定によってもほぼ同様の直径分布が示された。

【0057】

(比較例 1)

製造例 1 で得たケラチン水溶液の代わりに、特公昭 59-33017 号記載の方法によるケラチン加水分解物(平均分子量 2200)を用いた以外は実施例 3 と同様にしてマイクロカプセル化を試みた。

しかしながら、該水溶性ケラチン加水分解物より得られた粒状物質は極めてもろく、その水中分散体は室温で放置するのみで崩壊し内部のトルエンを遊離してしまった。

【0058】

(実施例 4)

広口試験管に製造例 2 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.4 重量%)(10mL)とトルエン(10mL)を入れ、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25 deg C にて 50W の出力で 3 分間、超音波照射した。

生じた白色懸濁液を 3000 回転/分で 15 分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。

同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後、凍結乾燥した。

得られた白色粉末状物質(約 0.11g)は、透過型電子顕微鏡観察によれば、比較的均一なマイクロカプセルであり、壁厚は約 0.02  $\mu$ m、直径は 1.2 乃至 1.5  $\mu$ m である。

白色粉末状物質の光散乱測定もほぼ同様の直径分布を示した。

原料のケラチン水溶液を凍結乾燥して得たケラチン粉末のアミノ酸分析では、アミノ酸 100 残基当たりシステインが 7.5 個、シスチンが 0.9 個であったが、マイクロカプセルではシスチン含量が

Furthermore twice after repeating, same washing operation lyophilizing was done.

white powder quality (Approximately 0.10 g) which it acquires, according to transmission electron microscope observation relatively with uniform microcapsule, was wall thickness approximately 0.02  $\mu$ m, diameter 1.2 to 1.5  $\mu$ m.

Almost similar diameter distribution was shown even with light scattering measurement of white powder quality.

【0057】

(Comparative Example 1)

In place of keratin aqueous solution which is acquired with Production Example 1, other than using keratin hydrolysate (average molecular weight 2200) with method which is stated in Japan Examined Patent Publication Sho 59-33017 number microencapsulation was tried with as similar to Working Example 3.

But, obtained granule quality quite is more brittle than said water solubility keratin hydrolysate, leaves the underwater dispersion with room temperature only to collapse toluene of the internal it separated.

【0058】

(Working Example 4)

While keratin aqueous solution which in wide mouth test tube is acquired with Production Example 2 (keratin concentration 1.4 weight%) (10 ml) with inserting toluene (10 ml), with magnet bar agitating mixture to the indirect, with 25 deg C 3 min, ultrasound irradiation it did with output of 50 W.

15 min centrifugation it did white suspension which it occurs with 3000 rpm, separated clouding solid substance, after stirring, centrifugation it did in same way including the water (20 ml).

Furthermore twice after repeating same washing operation, lyophilizing was done.

As for white powder quality (Approximately 0.11 g) which it acquires, according to transmission electron microscope observation, as for relatively with uniform microcapsule, as for wall thickness approximately 0.02  $\mu$ m, diameter they are 1.2 to 1.5  $\mu$ m.

light scattering measurement of white powder quality almost similar diameter distribution was shown.

lyophilizing doing keratin aqueous solution of starting material, with amino acid analysis of keratin powder which it acquires, per amino acid 100 residue cysteine was 7.5, cystine 0.9, but with microcapsule cystine content had increased in

約 8 個に増加していた。

他のアミノ酸残基は原料における値とほぼ一致した。

[0059]

(実施例 5)

広口試験管に製造例 2 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.4 重量%)(10mL)、30%過酸化水素水(0.05mL)とトルエン(10mL)を入れ、ボルテックスミキサーで 25 deg C で 5 分間激しく振動撹拌した。

生じた白色懸濁液を 2000 回転/分で 15 分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、撹拌後、同様に遠心した。

同じ洗浄操作を更に 2 回繰り返した後、凍結乾燥した。

得られた白色粉末状物質(約 0.11g)の透過型電子顕微鏡観察によれば、生じたマイクロカプセルの直径は、ややばらつくものの、3 乃至 10  $\mu$ m である。

[0060]

(実施例 6)

広口試験管に製造例 2 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.4 重量%)(10mL)とトルエン(10mL)を入れ、窒素ガス雰囲気下、25 deg C で 5 分間超音波処理した。

生じた白色懸濁液に 30%過酸化水素水(0.07mL)を加え、緩く振盪後、15 分放置した。

次いで 2000 回転/分で 15 分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、撹拌後、同様に遠心した。

同じ洗浄操作を更に 2 回繰り返した後、すぐ凍結乾燥した。

得られた白色粉末状物質(約 0.11g)の透過型電子顕微鏡観察によれば、生じたマイクロカプセルの直径は、ややばらつくものの、2 乃至 5  $\mu$ m である。

[0061]

(実施例 7)

広口試験管にコラーゲン(タイプ I)(0.5%、コーケン社製、I-PC)(10mL)を入れ、28%アンモニア水で弱アルカリにした。

approximately 8.

As for other amino acid residue almost it agreed with value in starting material.

[0059]

(Working Example 5)

keratin aqueous solution which in wide mouth test tube is acquired with Production Example 2 (keratin concentration 1.4 weight%) (10 ml), 30%hydrogen peroxide water (0.05 ml) with you inserted toluene (10 ml), with vortex mixer with 25 deg C 5 min it vibrated agitated extremely.

15 min centrifugation it did white suspension which it occurs with 2000 rpm, separated clouding solid substance, after stirring, centrifugation it did in same way including the water (20 ml).

Furthermore twice after repeating same washing operation, lyophilizing was done.

According to transmission electron microscope observation of white powder quality (Approximately 0.11 g) which it acquires, the diameter of microcapsule which it occurs, although it disperses a little, is 3 to 10  $\mu$ m.

[0060]

(Working Example 6)

keratin aqueous solution which in wide mouth test tube is acquired with Production Example 2 (keratin concentration 1.4 weight%) (10 ml) with you inserted toluene (10 ml), under nitrogen gas atmosphere, 5 min ultrasonic treatment did with 25 deg C.

After shaking, 15 min it left loosely in white suspension which it occurs including 30%hydrogen peroxide water (0.07 ml).

Next 15 min centrifugation to do with 2000 rpm, separate clouding solid substance, after stirring, the centrifugation it did in same way including water (20 ml).

Furthermore twice after repeating same washing operation, lyophilizing was done immediately.

According to transmission electron microscope observation of white powder quality (Approximately 0.11 g) which it acquires, the diameter of microcapsule which it occurs, although it disperses a little, is 2 to 5  $\mu$ m.

[0061]

(Working Example 7)

You inserted collagen (type I) (0.5%, co-ケン supplied, I-PC) (10 ml) in wide mouth test tube, with 28% ammonia water made the weak alkali.

ついで製造例 2 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.4 重量%)(6mL)を加え、50 deg C にて 10 乃至 15 分間振盪した。

当初ゲル化した混合物が流動液となった後、トルエン(10mL)を入れ、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25 deg C にて 35W の出力で 3 分間、超音波照射した。

生じた白色懸濁液を 2000 回転/分で 15 分間遠心し、白色固形物を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、更に遠心した。

同じ洗浄操作を更に 2 回繰り返した後、白色懸濁液を凍結乾燥した。

得られた白色粉末状物質(約 0.10g)は透過型電子顕微鏡観察によれば、比較的均一なマイクロカプセルであり、壁厚は約 0.02  $\mu$ m、直径 1.5 乃至 3  $\mu$ m である。

この白色粉末状物質の光散乱測定もほぼ同様の直径分布を示した。

[0062]

(実施例 8)

広口試験管にメルカプト基を担持したポリビニルアルコール(分子量 2000、SH 基 1 乃至 3 個)の 2.5%水溶液(3mL)を入れ、次いで製造例 2 で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度 1.4 重量%)(20mL)を加え、充分に振動攪拌した。

次いでシリコン油(ALDRICH 社)を 2 重量%溶解した 1-フルオロシクロヘキサン(10mL)を入れ、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25 deg C にて 50W の出力で 3 分間、超音波処理した。

生じた白色懸濁液を 2000 回/分で 15 分間遠心し、白濁固形物を分離し、純水(5mL)に分散保存した。

同分散液を凍結乾燥すると、約 0.28g の粉末が得られた。

分散液は、電子顕微鏡観察によれば、比較的均一な粒子を含み、光散乱測定によれば、2 乃至 8  $\mu$ m の主たる直径分布を示した。

上記遠心処理で分離した有機溶媒層が約 1 乃至 2mL と少ない上、その濃縮により得られた残渣のシリコン量が使用量の 5 乃至 20%であることから、シリコンがマイクロカプセルに包含されていることは明らかである。

Next 10 to 15 min shaking it did with 50 deg C including keratin aqueous solution (keratin concentration 1.4 weight% ) (6 ml ) which is acquired with Production Example 2.

While after mixture which start gelation is done becomes flow liquid, inserting toluene (10 ml ), with magnet bar agitating mixture to the indirect, with 25 deg C 3 min. , ultrasound irradiation it did with output of 35 W.

15 min centrifugation it did white suspension which it occurs with 2000 rpm, separated white solid, after stirring, furthermore centrifugation it did including water(20 ml ).

Furthermore twice after repeating same washing operation, white suspension the lyophilizing was done.

As for white powder quality (Approximately 0.10 g ) which it acquires according to transmission electron microscope observation, relatively with uniform microcapsule , wall thickness is approximately 0.02  $\mu$ m. , diameter 1.5 to 3  $\mu$ m.

light scattering measurement of this white powder quality almost similar diameter distribution was shown.

[0062]

(Working Example 8 )

You inserted 2.5% aqueous solution (3 ml ) of polyvinyl alcohol (molecular weight 2000. , SH group 1 to 3 ) which bears mercapto group in wide mouth test tube, to satisfactory it vibrated you agitated including keratin aqueous solution (keratin concentration 1.4 weight% ) (20 ml ) which is acquired next with Production Example 2.

Next while 1 -fluoro cyclohexane where 2 wt% it melts silicon oil (Aldrich corporation) inserting the(10 ml ), with magnet bar agitating mixture to indirect, with 25 deg C 3 min. , ultrasonic treatment it did with output of 50 W.

15 min centrifugation it did white suspension which it occurs with 2000 times per minute, separated clouding solid, in pure water (5 ml ) it dispersed retained.

When same dispersion lyophilizing is done, powder of approximately 0.28 g acquired.

dispersion according to electron microscope observation, including uniform particle relatively, according to light scattering measurement, showed main diameter distribution of 2 to 8  $\mu$ m.

From fact that amount of silicon of residue which is acquired organic solvent layer which is separated with above-mentioned centrifugation approximately 1 to 2 ml in addition to being little, with concentration is 5 to 20% of amount used, silicon as for containing package being done

【0063】

(実施例 9)

実施例 4 のトルエンの代わりにビタミン K の 3 重量%トルエン溶液(10mL)を用いる他は、全く同じ操作でマイクロカプセルを得た(0.30g)。

マイクロカプセルのエタノール分散液の紫外吸収スペクトル測定より、使用したビタミン K の 70%がマイクロカプセルに含包されていることが明らかとなった。

【0064】

【試験例 1】ケラチン膜からのケラチンの剥離量:

ガラス表面に、製造例 2 の方法で得たケラチン水溶液と特公昭 59-33017 号記載の方法による水溶性ケラチン加水分解物(同濃度:平均分子量 2200)とを用いて、それぞれケラチン薄膜(厚さ約 100  $\mu$ m)を調製した。

これを pH7.4 のトリス塩酸緩衝液に浸し、40 deg C にて振盪した。

水溶液を一定量採取し、溶解したタンパク質量を Lowry 法で定量し、剥離量を産出した。

結果を表 1 に示す。

【0065】

【表 1】

isclear in microcapsule.

【0063】

(Working Example 9)

Besides 3 wt% toluene solution (10 ml) of vitamin K are used in place of toluene of the Working Example 4, microcapsule was acquired completely with same operation (0.30 g).

From ultraviolet absorption spectral measurement of ethanol dispersion of microcapsule, 70% of vitamin K which is used containing package is done in microcapsule, it became clear.

【0064】

amount of release: of keratin from {Test Example 1} keratin film

In glass surface, respective keratin thin film (thickness approximately 100  $\mu$ m) was manufactured with method which is stated in keratin aqueous solution and Japan Examined Patent Publication Sho 59-33017 number which are acquired with method of Production Example 2 making use of water solubility keratin hydrolysate (Same concentration: average molecular weight 2200).

It soaked this in Tris HCl buffer of pH 7.4, shaking did with 40 deg C.

aqueous solution constant amount it recovered, quantification it did amount of protein which is melted with Lowry method, produced amount of release.

Result is shown in Table 1.

【0065】

【Table 1】

振盪時間	製造例 2 で得た ケラチン薄膜	特公昭59-33017の方法 で得たケラチン薄膜
1	0 %	3 0 %
5	0 %	9 0 %
2 4	2 %	1 0 0 %
7 2	3 %	—
1 2 0	5 %	—

## 【0066】

なお、特公昭 59-33017 号に記載の方法による平均分子量 15000 の水溶性ケラチン加水分解物を用いてケラチン薄膜の調製を試みたが、製膜化は困難であった。

## 【0066】

Furthermore, also manufacturing keratin thin film was tried with method which is stated in Japan Examined Patent Publication Sho 59-33017 number making use of water solubility keratin hydrolysate of the average molecular weight 15000, but film manufacture conversion was difficult.

## 【0067】

## 【発明の効果】

以上の通り、本発明によれば、天然ケラチンを壁材とし、壁厚が薄くしかも安定性が高い極めて微細且つ均一な粒径の高い含包量を有するマイクロカプセルを容易に製造することができる。

## 【0067】

## 【Effects of the Invention】

Sort above, according to this invention, natural keratin is designated as the wall material, wall thickness to be thin furthermore can produce microcapsule which possesses quite fine where stability is high and containing package quantity where uniform particle diameter is high easily.

また本発明のマイクロカプセルは、ケラチン加水分解物を壁材とする公知技術のマイクロカプセルと比較して、マイクロカプセルの製造効率、安定性等において格段に優れる。

In addition microcapsule of this invention by comparison with microcapsule of the publicly known technology which designates keratin hydrolysate as wall material, is superior markedly in production efficiency, stability etc of microcapsule.

更に、本発明のマイクロカプセルは、天然のケラチン鎖間の架橋を一旦切離し、再びこれを形成してなる再生天然ケラチンを壁材とするものであって、ケラチン鎖自身の切断等の非可逆的化學修飾を伴わないものであるため、生体適合性の点で好ましく、既述の通り多方面での利用が可能である。

Furthermore, being something which designates regeneration natural keratin where the microcapsule of this invention dissection does crosslinking between natural keratin chains once, forms this again and becomes as wall material, because it is something which does not accompany cutting or other irreversible chemical modification of keratin chain itself, it is desirable, previously mentioned sort utilization with multi directions possible in point of biocompatibility.